Thesis Title Studies on Aflatoxins and Mutagens in Urine

Name Mr. Nantarit Chokethaworn

Thesis For Master of Science in Biochemistry
Chiang Mai University, 1985

## Abstract

Aflatoxins, a group of very potent mutagen and carcinogen, which are produced by fungi and commonly found in foods and agricultural commodities. In this thesis, three aspects of aflatoxins were investigated. First, a sensitive, economical, and suitable method for analysis of aflatoxins and mutagens in urine had been modified by using Amberlite XAD-2 column followed by TLC and fluorometry. According to the column efficiency, the recoveries of free aflatoxins $B_1$ and $M_1$ from urine samples were 95.0 % and 92.5 % , respectively. The incubation of urinary residue with β-glucuronidase markedly increase the sensitivity and recovery of total excreted aflatoxins. Both free aflatoxin $B_1$ and other metabolites with their glucuronide conjugates were demonstrated to be retained on the Amberlite column. Second, excretion of aflatoxin $B_1$ and its metabolites had been investigated in adult male Sprague-Dawley rats (N = 5) given orally single feeding of aflatoxin $B_1$. Animal urine samples were collected at different periods after administration. The main urinary metabolite within 24 hours

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

after administration was aflatoxin $M_1$, maximally excreted in urine and accounted for 1.56-2.68 % of the administered dose, and only 0.41-0.84 % was excreted as aflatoxin $B_1$. The excretion rate of aflatoxin $M_1$ reached a maximum within 5.2 hours. Even at 48-50 hours after feeding, urine samples also contained some little amounts of aflatoxins $B_1$ and $M_1$. Third, single-voided urine samples from 146 vegetarians and 104 non-vegetarians were analyzed for aflatoxins and mutagens. It was found that by 2-dimensional TLC analysis only 1.6 % (4/250 cases) of total urine samples contained $AFB_1$-like fluorescent compound. All of these 4 cases are from vegetarians. By modified Ames' mutagenicity test (pre-incubation method), only 4.8 % (12/250 cases) of total subjects excreted mutagen(s) using Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100, either with or without S-9 mix.

It is suggested that the Amberlite column for the separation of aflatoxins and mutagens from urine should be further applied to other analytical methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), radioimmunoassay (RIA), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The study of such urinary aflatoxins and mutagen(s) would be greatly beneficial to the prevention of human cancer and other diseases.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่อง การศึกษาอะฟลาทอกซินและสารก่อการกลายพันธุ์ในปัสสาวะ

ชื่อผู้เขียน นายนันทฤทธิ์ โชคถาวร

วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2528

## บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ และก่อมะเร็งที่ร้ายแรงกลุ่มหนึ่ง ซึ่งผลิตขึ้นโดยเชื้อราที่พบบ่อยในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรทั่วไป ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาอะฟลาทอกซินใน 3 ด้าน ประการแรก ได้มีการปรับปรุงวิธีการที่ไว, ประหยัดและเหมาะสม เพื่อการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินและสารก่อการกลายพันธุ์ในปัสสาวะ โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยแอมเบอร์ไลท์ XAD-2 ตามด้วยการใช้เทคนิคทางทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีและฟลูออโรเมตตรี พบว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ดังกล่าว สามารถแยกอะฟลาทอกซินอิสระ บีหนึ่งและเอ็มหนึ่ง จากตัวอย่างปัสสาวะคืนกลับมา ได้ 95.0 % และ 92.5 % ตามลำดับ การนำส่วนสกัดที่ได้จากปัสสาวะมาอุ่นกับเบต้า-กลูคิวโรนิเดส สามารถเพิ่มความไวของการวิเคราะห์และการคืนกลับของอะฟลาทอกซินที่ขับถ่ายในปัสสาวะได้มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แอมเบอร์ไลท์คอลัมน์นี้สามารถจับอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ทั้งในรูปอิสระและกลูคิวโรไนด์คอนจูเกต รวมทั้งเมตะบอไลท์อื่น ๆ ได้ ประการที่สอง ได้ศึกษาการขับถ่ายอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง และเมตะบอไลท์ของมันในปัสสาวะของหนูขาวโตเต็มวัยเพศผู้ (N = 5) ซึ่งป้อนด้วยอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากป้อนได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะมาวิเคราะห์ พบว่าอะฟลาทอกซินเอ็มหนึ่งเป็นเมตะบอไลท์ที่ขับถ่ายออกมามากที่สุดในปัสสาวะ คิดเป็น 1.56-2.68 % ของปริมาณที่ป้อนเข้าไป และมีเพียง 0.41-0.84 % เท่านั้น ที่อยู่ในรูปของอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง การขับถ่ายอะฟลาทอกซิน เอ็มหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีอัตราเร็วสูงสุดภายในเวลา 5.2 ชั่วโมง หลังจากป้อน และช่วงเวลา 48-50 ชั่วโมง หลังจากป้อน พบว่าปัสสาวะยังคงมีอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง และเอ็มหนึ่งอยู่ปริมาณเล็กน้อย ประการที่สาม ได้วิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินและสารก่อการกลายพันธุ์ในปัสสาวะแบบถ่ายครั้งเดียวจากกลุ่มคนที่รับประทานอาหารมังสวิรัติเป็นประจำ 146 คน และกลุ่มที่รับประทานอาหารทั่วไป 104 คน เมื่อศึกษาโดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีแบบสองทิศทาง พบว่า 1.6 % (4/250 ราย) เท่านั้น มีสารเรืองแสงที่เหมือนกับอะฟลาทอกซิน บีหนึ่ง โดยทั้ง 4 รายที่พบอะฟลาทอกซินนี้อยู่ในกลุ่มคนที่รับประทานอาหารมังสวิรัติเป็นประจำ และพบว่า 4.8 % (12/250 ราย) มีสารก่อการกลายพันธุ์ในปัสสาวะ ซึ่งทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย ซาลโมเนลลา ไทฟิมิวเรียม TA 98 และ TA 100 ที่ต้องการหรือไม่ต้องการ S-9 mix ร่วมในขบวนการด้วย

จากผลการวิจัย ชี้ให้เห็นว่าการใช้แอมเบอร์ไลท์คอลัมน์เพื่อแยกอะฟลาทอกซิน และสารก่อการกลายพันธุ์จากปัสสาวะ อาจนำไปใช้ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ชนิดอื่น เช่น ไฮ-เปอร์ฟอร์มแมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟฟี, เรดิโออิมมูโนแอสเสย์, และเอนไซม์-ลิงค์ อิมมูโนซอบเบนท์แอสเสย์ การศึกษาอะฟลาทอกซินและสารก่อการกลายพันธุ์ในปัสสาวะจะเป็นประโยชน์มากในขั้นการป้องกันการเกิดมะเร็งและโรคอื่น ๆ ของคน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation to Assistant Professor Dr. Vichai Wongchai, Head of the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for his helpful suggestion, criticism, and all facilities provided by his department.

Great gratitude is expressed to Associate Professor Dr. Maitree Suttajit for his suggestions and encouragement throughout this thesis work, and also to Assistant Professor Usanee Vinitketkumnuan for her useful advices and suggestions for mutagenicity test.

I am thankful to Dr. Damrat Supyen, Lecturer of the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, for his valuable suggestions.

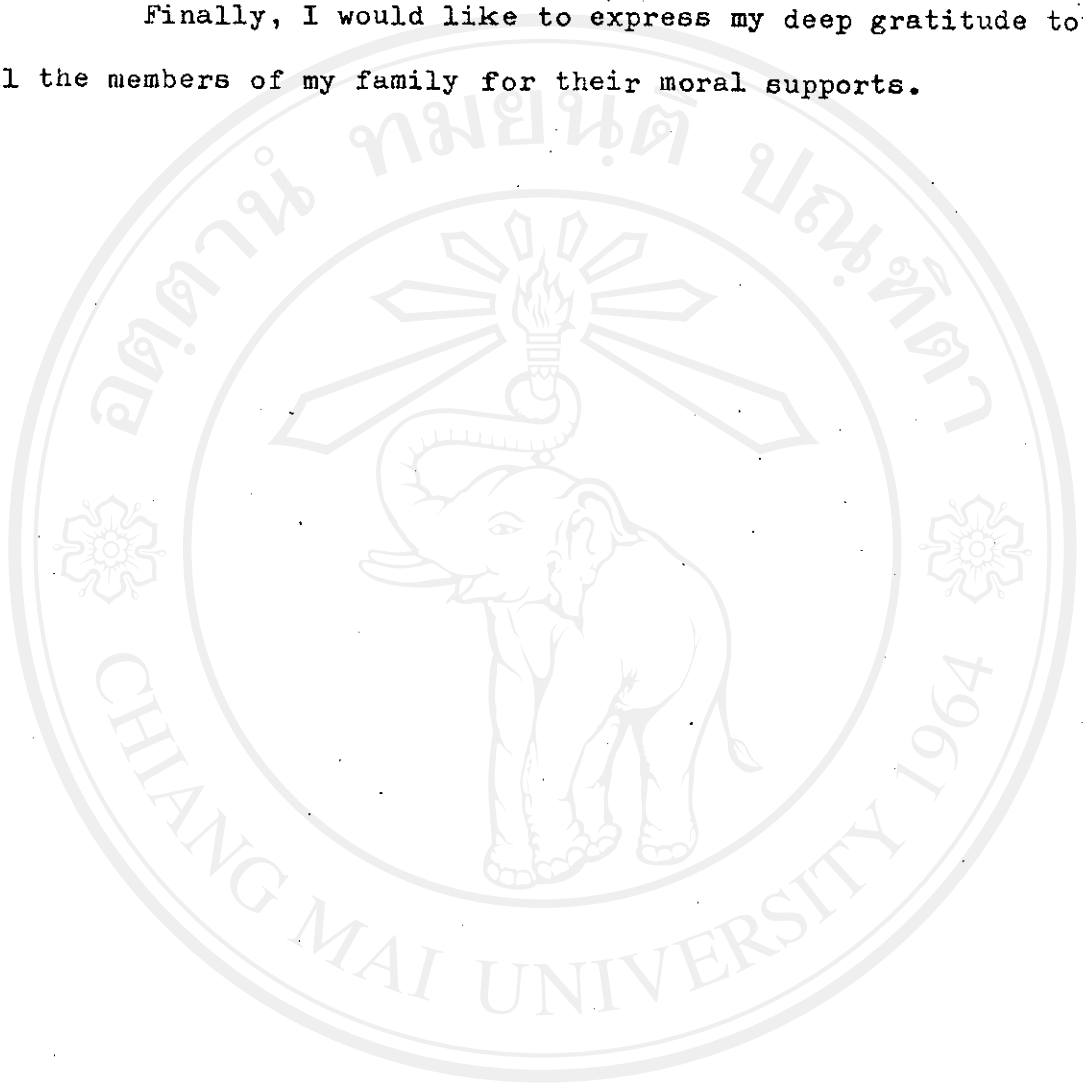
Sincere acknowledgement is conveyed to Professor Taijiro Matsushima, Department of Molecular Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan, for the provision of the supplies of the chemicals and modern instruments during the mutagenicity test.

I would like to extend my heartfelt appreciation to all friends and other persons who helped throughout this thesis work.


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Achknowledgements is extended to the Graduate School for the scholarship.

Finally, I would like to express my deep gratitude to all the members of my family for their moral supports.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved